Effet du phosphate et du calcium sur la croissance et l'accumulation ionique chez les champignons ectomycorhiziens en culture *in vitro*

DANIEL MOUSAIN

Laboratoire de recherches sur les symbiotes des racines, Institut national de la recherche agronomique, 9, Place Viala, 34060 Montpellier Cédex, France

ET

LOUIS SALSAC

Laboratoire de recherches sur les symbiotes des racines, Institut national de la recherche agronomique, 9, Place Viala, 34060 Montpellier Cédex, France

Reçu le 11 octobre 1983

MOUSAIN, D., et L. SALSAC. 1984. Effet du phosphate et du calcium sur la croissance et l'accumulation ionique chez les champignons ectomycorhiziens en culture *in vitro*. Can. J. Bot. **62**: 2600–2609.

L'effet de l'orthophosphate et du calcium sur la croissance et l'accumulation ionique a été étudié chez plusieurs champignons ectomycorhiziens (*Pisolithus tinctorius*, en particulier) en culture *in vitro*. La croissance "optimale" est obtenue pour des concentrations en orthophosphate très inférieures à celles des milieux usuels: elle peut être représentée par une fonction exponentielle dont les paramètres (croissance "maximale" et "concentration de demi-croissance maximale") ont été déterminés. Pour les faibles concentrations en phosphate ou en calcium du milieu, la masse de matière sèche des mycélia et leur teneur en ces deux éléments augmentent simultanément. Pour des concentrations élevées, une accumulation indépendante de la croissance est observée dans les thalles. Lorsque le mycélium de *P. tinctorius* accumule du phosphate et du calcium en quantités relativement importantes, il ne semble pas que ces accumulations s'effectuent corrélativement. Par contre, la corrélation entre l'accumulation de phosphore total et celle de potassium est significative. Le rapport du P acido-soluble au P total du mycélium diminue quand la concentration en orthophosphate du milieu augmente.

MOUSAIN, D., and L. SALSAC. 1984. Effet du phosphate et du calcium sur la croissance et l'accumulation ionique chez les champignons ectomycorhiziens en culture *in vitro*. Can. J. Bot. **62**: 2600–2609.

The orthophosphate and calcium influence on growth and ionic accumulation was studied in several ectomycorrhizal fungi (*Pisolithus tinctorius* included) grown *in vitro*. The "optimal" growth was obtained with $H_2PO_4^-$ concentrations much lower than those of usual media: it may be represented by an exponential function, the parameters ("maximal" growth and "concentration of half-maximal growth") of which were calculated. For low phosphate and calcium concentrations in the medium the dry matter mass of the mycelium and their content of the two elements increased simultaneously. For high concentrations, an accumulation independant of growth was observed in the thalli. When the *P. tinctorius* mycelium accumulated phosphate and calcium in relatively large amounts, these accumulations seemed to be not correlated. Rather, the correlation between the accumulation of total phosphorus and that of potassium was significant. The ratio of acid-soluble P to total P decreased in the mycelium when the orthophosphate concentration increased in the medium.

Introduction

Peu de travaux ont été consacrés à la nutrition minérale des champignons filamenteux en culture *in vitro*. Ils concernent essentiellement l'absorption de cations monovalents (K^+, Rb^+, Na^+) ou du sulfate par des Ascomycètes (Burnett 1976) et un Deutéromycète, le *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Shere et Jacobson 1970), et l'absorption d'ions azotés (NH_4^+, NO_3^-, NO_2^-) par des Zygomycètes et Deutéromycètes (Burnett 1976).

Ce domaine d'étude semble avoir été particulièrement négligé chez les champignons mycorhiziens dont certains peuvent être cultivés isolément *in vitro* sur des milieux relativement simples. Ces champignons ont surtout été étudiés du point de vue de la nutrition carbonée (Palmer et Hacskaylo 1970; Luppi et Fontana 1972; Duclos 1981) ou azotée (Melin et Mikola 1948; Melin et Norkrans 1948; Hacskaylo *et al.* 1954; Luppi et Fontana 1967; Lundeberg 1970; Pearson et Read 1975; ...). Plus rares sont les références relatives à l'influence de la concentration en orthophosphate ($H_2PO_4^-$) du milieu sur la croissance des thalles d'espèces mycorhiziennes cultivées *in vitro* (Duclos 1981; Gay 1978; Athanassiou 1979). Duclos (1981) a montré que la croissance optimale de cinq endophytes mycorhizogènes d'Éricacées est atteinte pour une concentration faible d'orthophosphate (0,125 méquiv. $\cdot L^{-1}$) dans le milieu. Des résultats obtenus antérieurement dans une expérience conduite en milieu périodiquement renouvelé, indiquent que la croissance maximale du *Pisolithus tinctorius* est atteinte pour $H_2PO_4^-$ 0,05 méquiv. $\cdot L^{-1}$ et qu'à la concentration la plus élevée en $H_2PO_4^-$ du milieu (2,5 méquiv. $\cdot L^{-1}$) correspond une accumulation en phosphore total dans le mycélium de 0,36 méquiv. $H_2PO_4^-$ par gramme de matière sèche (Mousain *et al.* 1981). En outre, les résultats de Duclos (1981) suggèrent que l'ion Ca^{2+} n'est indispensable à certains champignons qu'en très faibles quantités; les parois de ces végétaux contiennent d'ailleurs peu de pectates qui, chez les végétaux supérieurs, sont des sites d'accumulation de ce cation (Lamant *et al.* 1977). Par contre, les taux de phosphore généralement élevés des thalles pourraient être dus à des accumulations de phosphate de calcium insoluble. Nous avons donc étudié simultanément l'effet des concentrations en $H_2PO_4^-$ et en Ca^{2+} sur la croissance des thalles et l'accumulation de ces deux ions dans le mycélium.

Matériel et méthodes

Culture des thalles mycéliens

Matériel fongique

Dans tous les essais, a été utilisé un isolat du *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch., obtenu par Athanassiou (1979) à partir de mycorhizes synthétisées chez le *Pinus pinaster*. Dans un essai, a également été employé un isolat de chacune des trois espèces de *Suillus* suivantes: *Suillus bellinii* (Inz.) Marchand, *S. granulatus* (L. ex Fr.) O. Küntze et *S. luteus* (L. ex Fr.) S. F. Gray. Le premier et le troisième isolats ont été obtenus à partir de carpophores récoltés

respectivement sous *Pinus pinaster* dans la dune landaise et sous *Pinus sylvestris* en sol calcaire dans le sud du Massif Central; le second isolat provient de carpophores récoltés sous un jeune peuplement de *Pinus nigra* subsp. *laricio* de Corse développé sur sol brun calcaire dans l'est de la France.

Conditions de culture

(i) Croissance des thalles de quatre champignons ectomycorhiziens

Des implants mycéliens issus de cultures-mères réalisées sur une gélose nutritive avec 0,05 méquiv. · L^{-1} de $H_2PO_4^-$, sont répartis sur des milieux liquides plus ou moins concentrés en $H_2PO_4^-$ suivant Calleja *et al.* (1980). Chacune des 6 à 8 répétitions par traitement est réalisée avec 40 mL de solution. Les huit milieux comportent KNO_3 2 m*M*, NH_4Cl 1 m*M*, $CaCl_2$ 0,25 m*M* et $MgSO_4$ 1 m*M*.

Les sept milieux avec $H_2PO_4^- \leq 2$ méquiv. · L^{-1} comprennent, en outre, du NaCl 0,4 m*M*, du K_2SO_4 0,5 m*M*, du KH_2PO_4 de molarité croissante (0,001 m*M*; 0,01 m*M*; 0,05 m*M*; 0,1 m*M*; 0,5 m*M*; 1 m*M*; 2 m*M*) et des quantités de KCl telles que la concentration en K^+ soit constante (5 méquiv. · L^{-1}).

Le milieu avec 5 méquiv. · L^{-1} de $H_2PO_4^-$ contient du NaH_2PO_4 2 m*M* et du KH_2PO_4 3 m*M*.

(ii) Étude de la croissance et de l'accumulation ionique chez le Pisolithus tinctorius

Les cultures-mères ont été réalisées comme précédemment sur une gélose nutritive contenant 0,05 méquiv. · L^{-1} de $H_2PO_4^-$ et 0,2 méquiv. · L^{-1} de Ca^{2+}. Les thalles sont cultivés sur 90 mL de milieu liquide. Tous les milieux comportent KCl 2 m*M*, KNO_3 2 m*M*, NH_4Cl 1 m*M*, K_2SO_4 0,5 m*M* et $MgSO_4$ 1 m*M*.

Les milieux de différentes concentrations en $H_2PO_4^-$ comprennent, en plus, du $CaCl_2$ 5 m*M* et du NaH_2PO_4 de molarité croissante (0,01 m*M*; 0,025 m*M*; 0,05 m*M*; 0,1 m*M*; 0,25 m*M*; 0,5 m*M*; 1 m*M* et 2,5 m*M*). Aux quatre milieux avec $H_2PO_4^- \leq 0,1$ méquiv. · L^{-1}, on ajoute du NaCl pour que la concentration du milieu en Na^+ soit 0,2 méquiv. · L^{-1}.

Les milieux de différentes concentrations en Ca^{2+} comprennent aussi du NaH_2PO_4 1 m*M* et du $CaCl_2$ en quantités telles que les concentrations en Ca^{2+} soient 0,1, 0,25, 1, 2,5, 5, 10 et 20 méquiv. · L^{-1}.

Les concentrations en phosphore et en calcium des milieux de culture varient évidemment au cours de la croissance des thalles. Des mesures préliminaires de la teneur en P des thalles ayant permis de définir une consommation théorique journalière de P, il a été nécessaire de renouveler le milieu de culture tous les 3 à 5 jours (à partir du 10e jour environ) pour éviter l'épuisement total du phosphate. En pratique, les milieux de différentes concentrations en $H_2PO_4^-$ ont été renouvelés en totalité aux 11e, 14e, 17e et 20e jours de croissance.

Le calcul précédent appliqué à la teneur en calcium des thalles a permis de vérifier qu'il n'est pas nécessaire de renouveler les milieux de concentration variable en Ca^{2+}.

(iii) Évolution du phosphore acido-soluble et du phosphore total chez le Pisolithus tinctorius

La composition de base des milieux en éléments majeurs autres que le phosphore est identique à celle utilisée lors de la première expérience de croissance (milieux avec $H_2PO_4^- \leq 2$ méquiv. · L^{-1}). Les milieux comprennent du KH_2PO_4 de molarité croissante: 0,005 m*M*; 0,01 m*M*; 0,025 m*M*; 0,05 m*M*; 0,1 m*M*; 0,25 m*M*; 0,5 m*M* et 1 m*M*. Le milieu avec 2,5 méquiv. · L^{-1} de $H_2PO_4^-$ ne comporte ni NaCl ni K_2SO_4 mais, outre les sels précédents, du KH_2PO_4 2,5 m*M* et du KCl 0,5 m*M*.

Les milieux de concentration en $H_2PO_4^-$ inférieure ou égale à 0,25 méquiv. · L^{-1} ont été renouvelés cinq fois (9e, 11e, 14e, 16e et 18e jours) contre deux seulement (14e et 16e jours) pour les milieux les plus concentrés en $H_2PO_4^-$.

(iv) Modalités communes aux différents essais

Pour 1 L de chacun des milieux, sont ajoutés 0,5 mL de citrate ferrique en solution à 1%; 0,2 mL d'une solution-mère de micro-éléments (Morizet et Mingeau 1976); 100 µg de thiamine-HCl; 10 g de glucose.

Le pH est ajusté à 5,5 avec NaOH 0,1 *N* avant autoclavage des milieux pendant 30 min à 115–120°C.

Les cultures, non agitées, sont placées à l'obscurité et à 24 ± 1°C.

Dosages, mesures de croissance et analyses de pH

Les essais sont arrêtés après 20 à 25 jours, à une exception près (45 jours). Le mycélium est séparé du milieu de culture par filtration puis, soit lavé à l'eau distillée et mis à sécher 24 h à 80°C pour la détermination du poids de matière sèche et les dosages de cations ou de P total, soit lavé avec une solution de glucose isotonique (1%) et lyophilisé et pesé avant dosage du P acido-soluble. On mesure le pH du milieu après culture du mycélium.

Le dosage du P total est effectué selon d'Auzac et Pujarniscle (1959); la colorimétrie du complexe est réalisée suivant Taussky et Shorr (1953).

Les thalles réservés pour le dosage du phosphate acido-soluble sont homogénéisés dans un tampon cacodylate 50 m*M*, pH 6, contenant du β-mercaptoéthanol 5 m*M*. Le P acido-soluble est déterminé par colorimétrie (Taussky et Shorr 1953) après précipitation des protéines de l'homogénat par de l'acide trichloracétique.

Le dosage des cations s'effectue sur les extraits en solution utilisés pour le dosage du P total, par spectrophotométrie d'émission de flamme (K^+) ou d'absorption atomique (Ca^{2+}).

Analyses statistiques

La loi des effets des facteurs de croissance, peut prendre la forme suivante:

[1] $M = M_m(1 - e^{-kC})$ (Mitscherlich 1954)

où M représente la masse de matière sèche de mycélium, M_m la masse maximale moyenne de matière sèche de mycélium et C la concentration en orthophosphate du milieu de culture. Pour chaque espèce, les croissances "maximales" (M_m) sont déterminées expérimentalement (moyenne des points moyens situés sur le plateau de la courbe de croissance). Des "concentrations de demi-croissance maximale" (valeurs de C pour lesquelles $M = 0,5\ M_m$) ont été calculées à l'aide de l'équation 1 précédente.

Les résultats des mesures de croissance ont été soumis à une analyse de variance selon Newman et Keuls (Dagnélie 1975).

Résultats et discussion

Effet de l'orthophosphate sur la croissance des thalles en milieux non renouvelé

Les courbes représentatives de la croissance de quatre champignons en fonction de la concentration en orthophosphate sont données dans la figure 1. Les plateaux de ces courbes sont atteints pour des concentrations de 0,1 à 0,5 méquiv. · L^{-1}. Il a été vérifié que deux de ces courbes s'ajustent à des exponentielles selon l'équation 1 précédente (fig. 1A et 1D). Les valeurs des "concentrations de demi-croissance maximale" ont donc pu être calculées pour *P. tinctorius* (fig. 1A) et *S. luteus* (fig. 1D); elles sont respectivement de 0,034 méquiv. $H_2PO_4^-$ · L^{-1} et 0,030 méquiv. $H_2PO_4^-$ · L^{-1}, les coefficients de régression r étant significatifs à $P = 0,01$: $r = -0,998$ (fig. 1A); $r = -0,996$ (fig. 1D).

Le calcul précédent n'a pu être effectué pour les *S. bellinii* (fig. 1B) et *S. granulatus* (fig. 1C), le plateau de croissance de ces champignons ayant été atteint dès les plus faibles concentrations en phosphate du milieu (0,1 méquiv. $H_2PO_4^-$ · L^{-1}).

Effet de l'orthophosphate sur la croissance du mycélium de P. tinctorius *en milieu renouvelé*

Lorsque le milieu de culture est renouvelé périodiquement, la courbe de croissance du mycélium de *P. tinctorius* (fig. 2A) s'ajuste à une exponentielle (fig. 2B, *b*), comme la précédente obtenue en milieu non renouvelé (fig. 1A et fig. 2B, *a*), le coefficient de régression ($r = -0,983$) étant significatif à

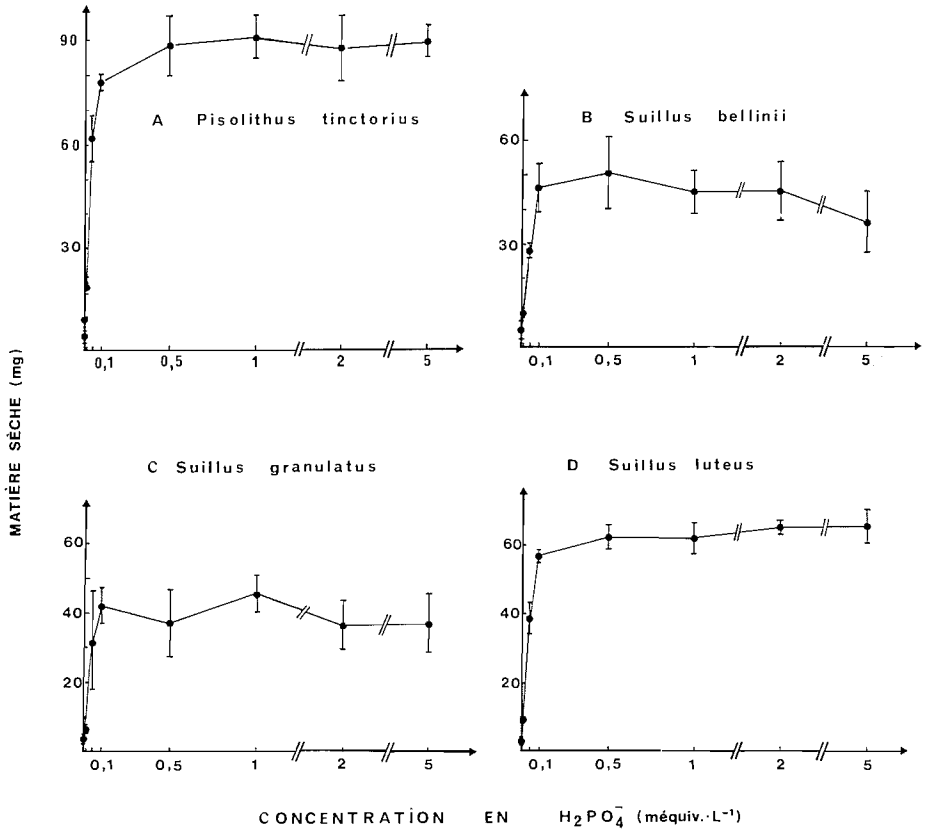

FIG. 1. Croissance du mycélium de quatre champignons mycorhiziens en fonction de la concentration en orthophosphate ($H_2PO_4^-$) d'un milieu de culture non renouvelé. Les intervalles de confiance des moyennes des masses de matière sèche sont figurés pour $P = 0,05$. (A) *Pisolithus tinctorius* (après 45 jours); (B) *Suillus bellinii* (après 24 jours); (C) *Suillus granulatus* (après 24 jours); (D) *Suillus luteus* (après 24 jours).

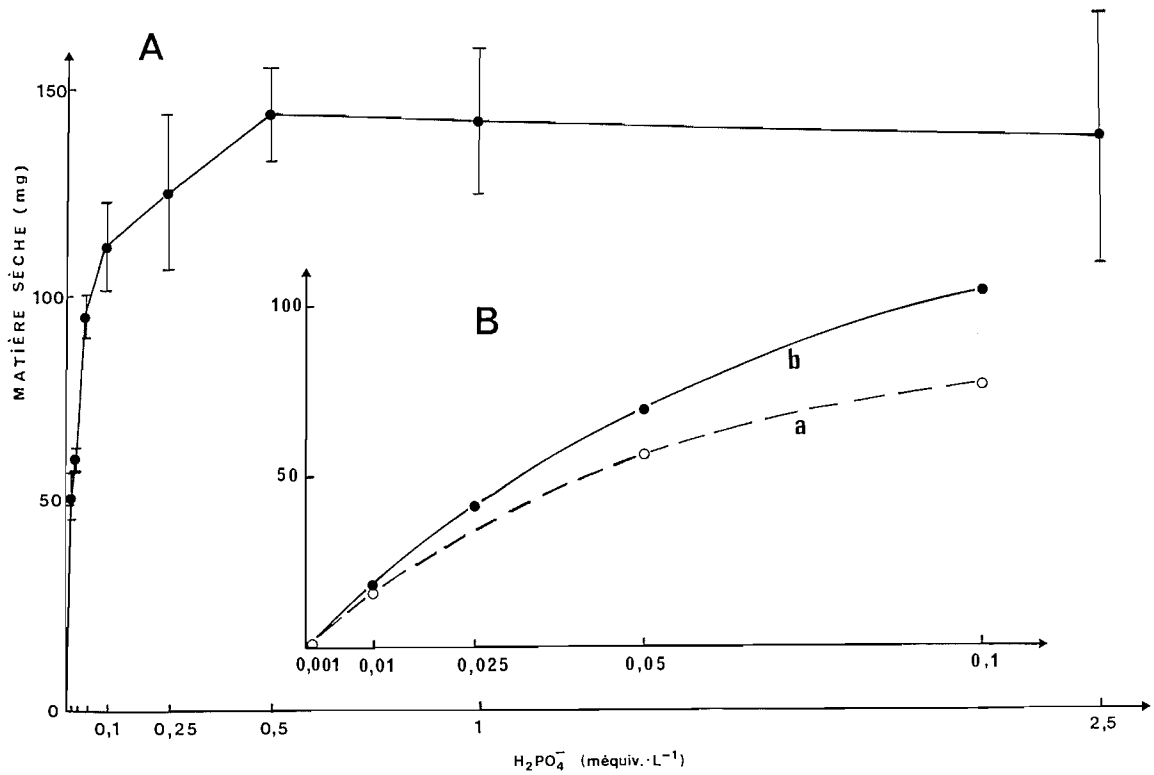

FIG. 2. Croissance du mycélium de *Pisolithus tinctorius* en fonction de la concentration en orthophosphate ($H_2PO_4^-$) du milieu de culture. (A) Courbe de croissance avec intervalles de confiance des moyennes des masses de matière sèche pour $P = 0,05$. Résultats obtenus en milieu périodiquement renouvelé (après 25 jours d'expérience). (B) Courbes théoriques de croissance pour $H_2PO_4^- \leqslant 0,1$ méquiv. · L^{-1}: (*a*) en milieu non renouvelé (après 45 jours); (*b*) en milieu renouvelé (après 25 jours).

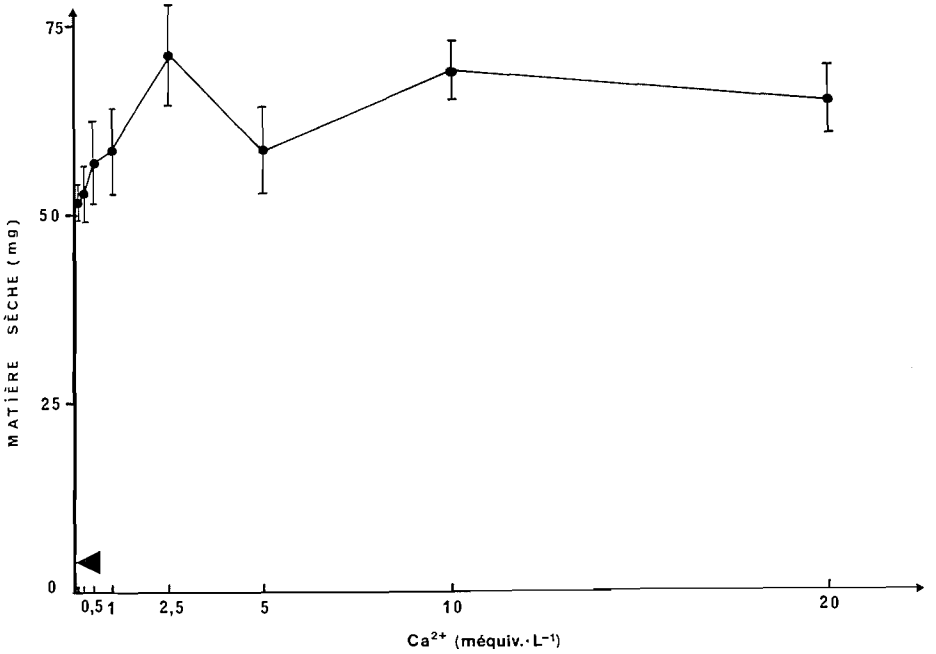

FIG. 3. Croissance du mycélium de *Pisolithus tinctorius* en fonction de la concentration en calcium du milieu de culture (après 20 jours d'expérience). La pointe de la flèche indique la masse maximale moyenne d'un implant mycélien (4 mg de matière sèche). Les intervalles de confiance des moyennes des masses de matière sèche sont figurés pour $P = 0,05$.

TABLEAU 1. Moyennes et intervalles de confiance ($P = 0,05$) des pH des milieux de culture du *P. tinctorius* après 25 jours de croissance (milieu renouvelé 5 jours auparavant)

Concentration en $H_2PO^-_4$ (méquiv · L^{-1})	pH du milieu
0,010	3,10±0,03
0,025	3,03±0,03
0,050	2,90±0,03
0,100	3,01±0,04
0,250	3,07±0,09
0,500	3,27±0,49
1,000	3,35±0,18
2,500	3,61±0,50

$P = 0,01$. La "concentration de demi-croissance maximale" (0,049 méquiv. $H_2PO^-_4 \cdot L^{-1}$) est peu différente de celle calculée d'après les données de la figure 1A. Par contre, la croissance "maximale" est significativement plus faible en milieu non renouvelé (88,6 mg de matière sèche par thalle; fig. 1A) qu'en milieu renouvelé (136,7 mg de matière sèche par thalle; fig. 2A). Ce résultat plus faible n'est pas dû à l'épuisement du milieu en phosphate qui ne se produit pas pour des concentrations de plusieurs dixièmes de milliéquivalents de $H_2PO^-_4$. Par contre, au cours de la première expérience, le non-renouvellement de la solution nutritive entraîne une disparition presque totale de l'azote dans le milieu dès que la masse des thalles est voisine de 50 mg de matière sèche; cette hypothèse, fondée sur le calcul de l'azote disponible dans le milieu au début de l'expérience et sur la connaissance de la teneur moyenne en azote des tissus végétaux (3%), est confirmée par les données analytiques de Mention et Plassard (1983).

Les faibles concentrations en orthophosphate (inférieures à 0,1 méquiv. · L^{-1}) limitent cependant fortement la croissance du mycélium (fig. 2B).

Effet du calcium sur la croissance du mycélium du P. tinctorius

La croissance du *P. tinctorius* est significativement diminuée pour des concentrations en Ca^{2+} inférieures à 0,25 méquiv. · L^{-1} (fig. 3); au-delà de ces valeurs, la concentration en calcium n'améliore plus cette croissance. Des concentrations de l'ordre de 1 méquiv. · L^{-1} sont très largement suffisantes pour assurer une croissance optimale du *P. tinctorius*. Des concentrations de 10 à 20 méquiv. · L^{-1} n'affectent pas la croissance de cette espèce considérée comme calcifuge. Le poids de matière sèche d'un implant mycélien est au maximum de 4 mg: par conséquent, la plus faible des concentrations utilisées (0,1 méquiv. · L^{-1}) assure une croissance très importante représentant déjà les deux tiers de la croissance maximale (fig. 3).

Évolution du pH du milieu de culture du P. tinctorius *au cours de la croissance de ce champignon*

Les mesures de pH ont été effectuées après 25 jours de croissance des thalles sur des milieux plus ou moins concentrés en $H_2PO^-_4$ et qui ont été renouvelés pour la quatrième fois au 20e jour de croissance: la baisse apparente de pH est de 1,9 à 2,6 unités en 5 jours au plus (tableau 1). Cette baisse n'est pas totalement imputable à l'activité du champignon car l'autoclavage diminue le pH initial d'environ 0,5 à 1,5 unités. Néanmoins le mycélium exsorbe une quantité importante d'ions H^+; ceci confirme des observations antérieures (Salsac *et al.* 1982).

Après 20 jours de croissance du *P. tinctorius* en fonction de la concentration en Ca^{2+}, la baisse de pH du milieu est comparable.

Aux pH des milieux mesurés après culture du *P. tinctorius* (2,9 à 3,6), les ions $H_2PO^-_4$ représentent encore 86 à 97% du phosphore inorganique présent dans ces milieux.

La diminution du pH du milieu étant du même ordre de grandeur quelles que soient les concentrations externes en $H_2PO^-_4$ ou en Ca^{2+}, elle ne modifie certainement pas la forme générale des courbes de croissance; il est néanmoins possible

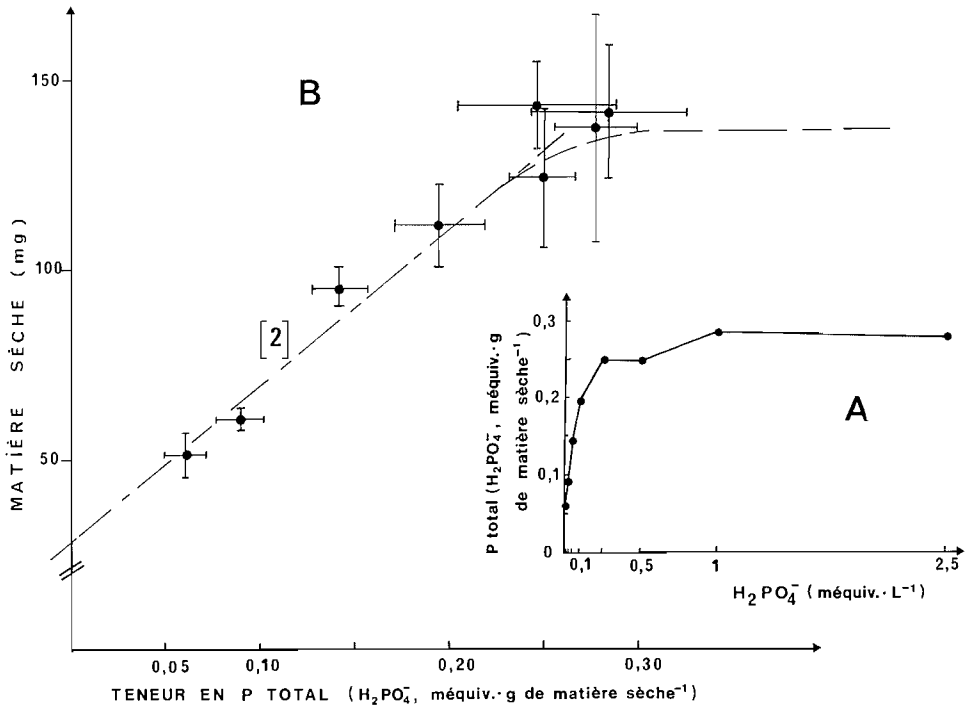

FIG. 4. (A) Courbe d'accumulation du phosphore total dans les thalles du *Pisolithus tinctorius* en fonction de la concentration en orthophosphate du milieu de culture. Expression des teneurs moyennes en P total en méquivalents de $H_2PO_4^-$ par gramme de matière sèche. (B) Représentation de la croissance du *P. tinctorius* en fonction de la teneur des thalles en P total. Les moyennes sont exprimées respectivement en milligrammes de matière sèche et en méquivalents de $H_2PO_4^-$ par gramme de matière sèche. Les intervalles de confiance sont figurés pour $P = 0,05$. La croissance (y) est une fonction linéaire de la teneur en P total (x) pour les points correspondant à $H_2PO_4^-$ dans le milieu $\leq 0,250$ méquiv. · L^{-1}, soit

[2] $y = 405,4x + 28,9$

qu'elle limite cette croissance.

Accumulation ionique chez le mycélium du P. tinctorius

Accumulation du phosphore total

Les quantités d'ions accumulées dans les mycélia de champignons dépendent de la concentration de ces ions dans le milieu et de la croissance des mycélia à cette concentration.

La teneur maximale en P total du mycélium, atteinte pour une concentration externe en phosphate de 0,25 méquiv. · L^{-1}, est comprise entre 0,25 et 0,30 méquiv. $H_2PO_4^-$ · g de matière sèche^{-1} (fig. 4A), soit 0,8 à 0,9% de P par gramme de tissu sec. Ce taux est du même ordre de grandeur que ceux mesurés dans le mycélium de nombreux Ascomycètes et Deutéromycètes cultivés *in vitro* (Beever et Burns 1980); il est plus élevé que ceux des tissus de la plupart des plantes supérieures qui varient de 0,2 à 0,4% (Bieleski 1973): le mycélium des Basidiomycètes ectomycorhiziens est donc un remarquable accumulateur de phosphate.

Lorsque la croissance d'un végétal est limitée par la déficience d'un élément dans le milieu nutritif, l'addition de cet élément augmente simultanément son accumulation dans la plante et la croissance de celle-ci. Une courbe théorique reliant ces deux variables (croissance de la plante et accumulation de l'élément) a souvent été proposée (Prévot et Ollagnier 1957; Smith 1962; Mengel et Kirkby 1979); en principe, cette courbe permet de mettre en évidence une teneur, appelée niveau critique, au-delà de laquelle l'élément peut continuer à s'accumuler sans augmentation de la croissance. Cette accumulation a souvent été dénommée "consommation de luxe" (Prévot et Ollagnier 1957; Mengel et Kirkby 1979).

La figure 4B (qui reprend les données de la figure 4A) suggérerait que la croissance est une fonction linéaire de la teneur en P des thalles jusqu'à environ 0,25 méquiv. $H_2PO_4^-$ · g matière sèche^{-1}; au-delà de cette teneur, il n'y a plus d'augmentation ni de la croissance ni de l'accumulation de l'élément (fig. 4B).

Ce résultat n'est toutefois pas général car les figures 6B, en particulier, et 6C indiquent que le phosphore peut s'accumuler dans les thalles indépendamment de la croissance.

Accumulation du calcium

L'accumulation du calcium dans les thalles du *P. tinctorious* est importante et la courbe de la teneur en Ca^{2+} de ces thalles en fonction de la concentration en Ca^{2+} du milieu ne semble pas avoir atteint un plateau dans les conditions de notre expérience (fig. 5A).

L'accumulation du Ca^{2+} dans le mycélium et dans les racines des végétaux supérieurs ne sont pas comparables. En effet, des teneurs du même ordre de grandeur que celles mesurées dans les thalles pour une concentration externe de 20 méquiv. Ca^{2+} · L^{-1}, sont atteintes dans les racines pour environ 0,1 méquiv. Ca^{2+} · L^{-1} dans le milieu externe et elles n'augmentent pratiquement plus sauf pour des concentrations très élevées (Ghorbal et Salsac 1972; Salsac 1973). Les parois des hyphes mycéliennes ne contiennent pratiquement pas de pectate et elles ne peuvent donc être des sites d'adsorption du Ca^{2+} comme les parois cellulosiques des plantes supérieures (Lamant *et al.* 1977). Compte tenu des quantités accumulées, la majorité du calcium accumulé dans les cellules fongiques pourrait être localisée dans la vacuole; en effet, une teneur de 0,4 méquiv. Ca^{2+} · g de matière sèche^{-1} représente une concentration moyenne de 40 méquiv. Ca^{2+} · L^{-1}, concentration

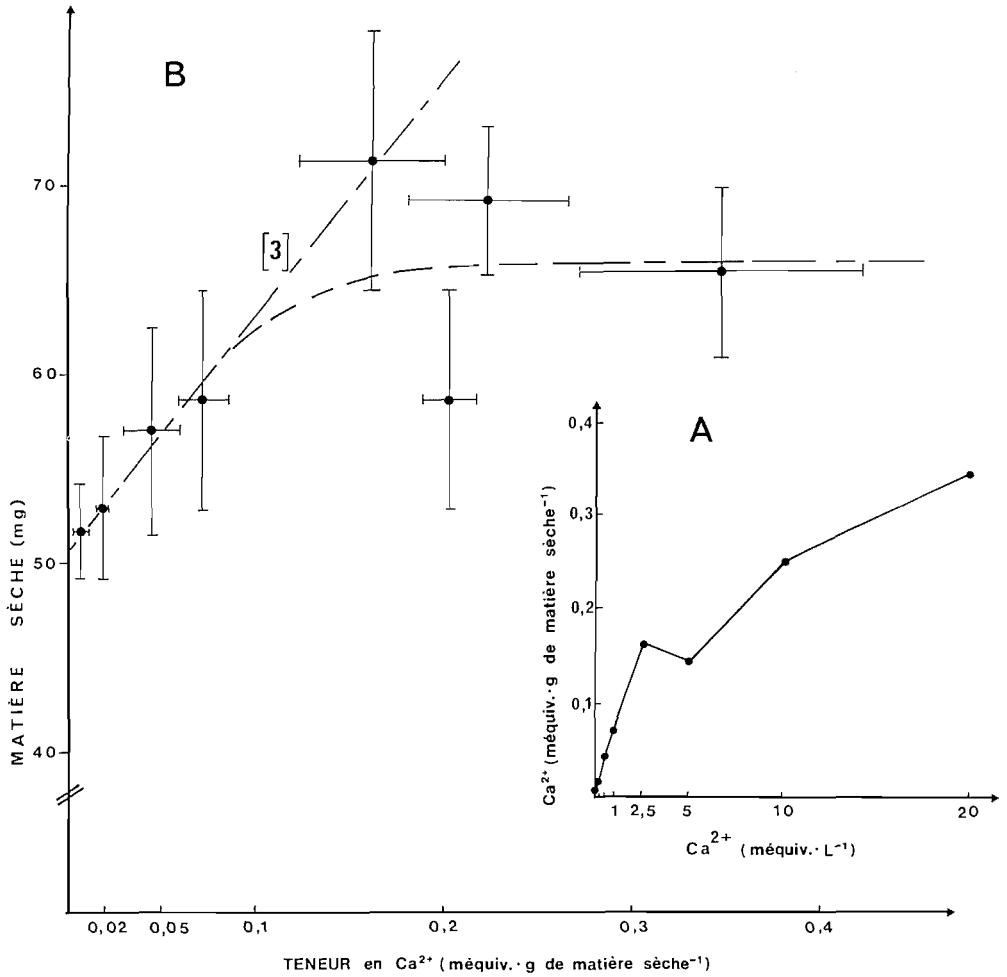

FIG. 5. (A) Courbe d'accumulation du calcium dans les thalles du *Pisolithus tinctorius* en fonction de la concentration en calcium du milieu de culture. Expression des teneurs moyennes en calcium en méquivalents de Ca^{2+} par gramme de matière sèche. (B) Représentation de la croissance du *P. tinctorius* en fonction de la teneur des thalles en calcium. Les moyennes sont exprimées respectivement en milligrammes de matière sèche et en méquivalents de Ca^{2+} par gramme de matière sèche. Les intervalles de confiance sont figurés pour $P = 0,05$. La croissance (y) est une fonction linéaire de la teneur en Ca (x) pour les points correspondant à Ca^{2+} dans le milieu $\leq 2,5$ méquiv. $\cdot L^{-1}$, soit

[3] $y = 125,2x + 50,6$

incompatible avec celles qui sont habituellement attribuées au cytoplasme. À l'extérieur des cellules fongiques, le calcium s'accumule aussi parfois sous forme de cristaux d'oxalate de calcium à la surface des hyphes: ce phénomène a été observé chez d'autres espèces fongiques (Froidevaux et Kalin 1981; Lapeyrie 1983).

La figure 5B (construite à partir des données de la figure 5A) montre que pour le *P. tinctorius* cultivé *in vitro*, le niveau critique du calcium serait inférieur à 0,2 méquiv. $Ca^{2+} \cdot$ g de matière sèche^{-1} car l'accumulation supplémentaire de calcium dans le mycélium n'entraîne pas d'augmentation significative de la masse de ce mycélium.

Évolution des teneurs en phosphore acido-soluble et en phosphore total du mycélium

La teneur du mycélium de *P. tinctorius* en P total et en fraction acido-soluble de ce phosphore augmentent encore pour des concentrations élevées en $H_2PO_4^-$ dans le milieu (fig. 6A), mais le rapport du P acido-soluble au P total diminue très rapidement en fonction de la concentration externe en $H_2PO_4^-$ (tableau 2).

La différence entre ces deux teneurs (9 à 68% du P total) est due vraisemblablement en partie à la formation de polyphosphates inorganiques contenant au moins 10 atomes de P. En effet, le phosphore dit "acido-soluble" inclut l'orthophosphate, du P organique soluble et les polyphosphates de faible masse moléculaire qui sont extraits par l'acide trichloracétique à 1% (Langen et Liss 1958; Kulaev 1975); de plus, la synthèse de polyphosphates semble être fonction de la richesse du milieu en $H_2PO_4^-$ (Clément et Mousain 1983).

TABLEAU 2. Moyennes et intervalles de confiance ($P = 0,05$) des pourcentages du rapport des teneurs en P acido-soluble et P total du mycélium de *P. tinctorius* après 21 jours de croissance

Concentration en $H_2PO_4^-$ (méquiv. $\cdot L^{-1}$)	$\frac{\text{P acido-soluble}}{\text{P total}} \times 100$
0,010	90,8±16,6
0,025	69,9±16,7
0,050	56,6±14,1
0,100	40,7±10,1
0,250	33,6±13,5
0,500	35,9±10,1
1,000	35,4±10,1
2,500	32,0±7,0

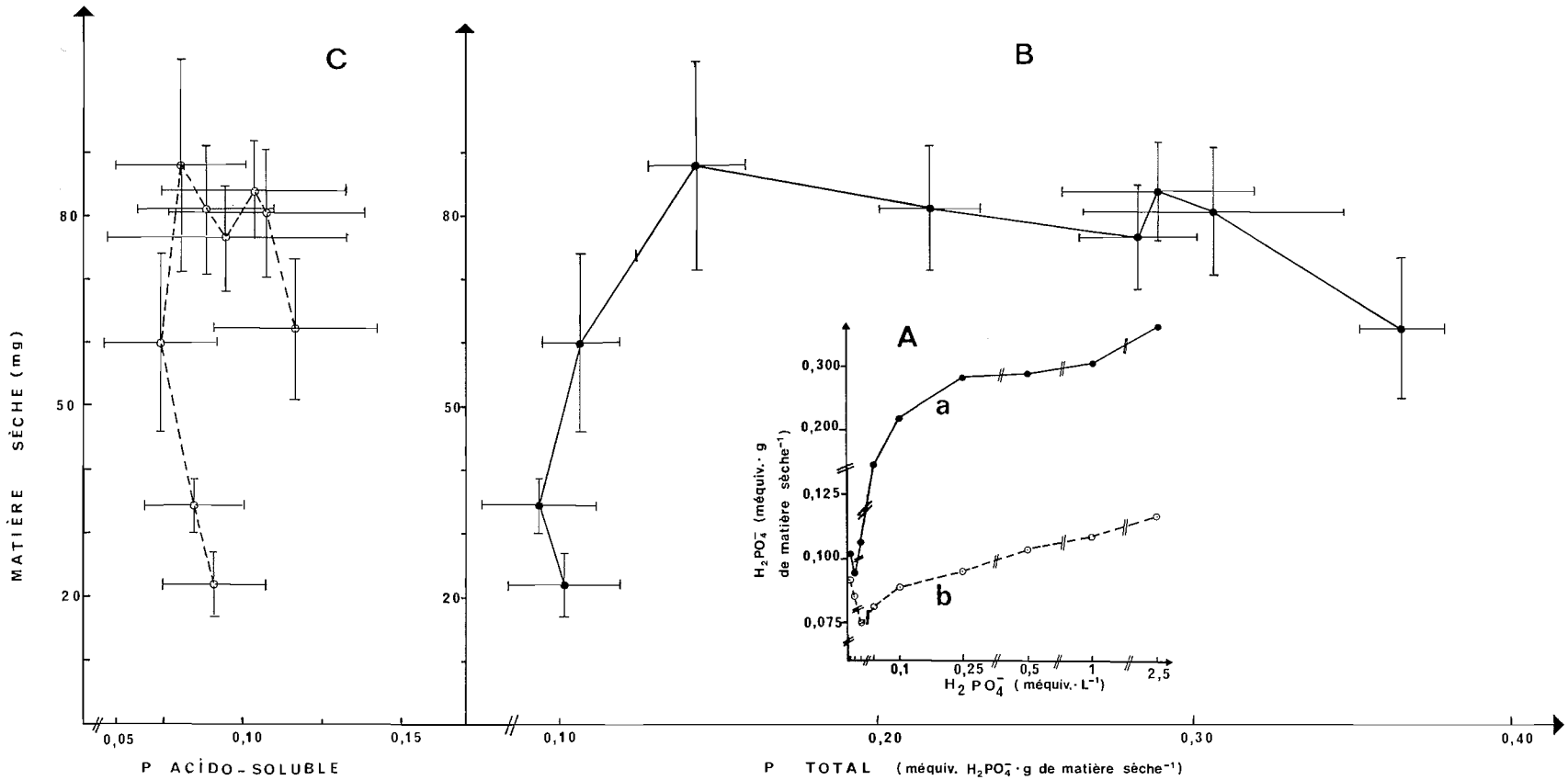

FIG. 6. (A) Courbes d'accumulation du phosphore dans les thalles du *Pisolithus tinctorius* en fonction de la concentration en orthophosphate du milieu. Expression des teneurs moyennes en P total (*a*) et P acido-soluble (*b*) en méquivalents de $H_2PO_4^-$ par gramme de matière sèche. (B et C) Représentation de la croissance du *P. tinctorius* en fonction de la teneur des thalles en P total (B) ou en P acido-soluble (C). Les moyennes sont exprimées respectivement en milligrammes de matière sèche et en méquivalents de $H_2PO_4^-$ par gramme de matière sèche. Les intervalles de confiance sont figurés pour $P = 0{,}05$.

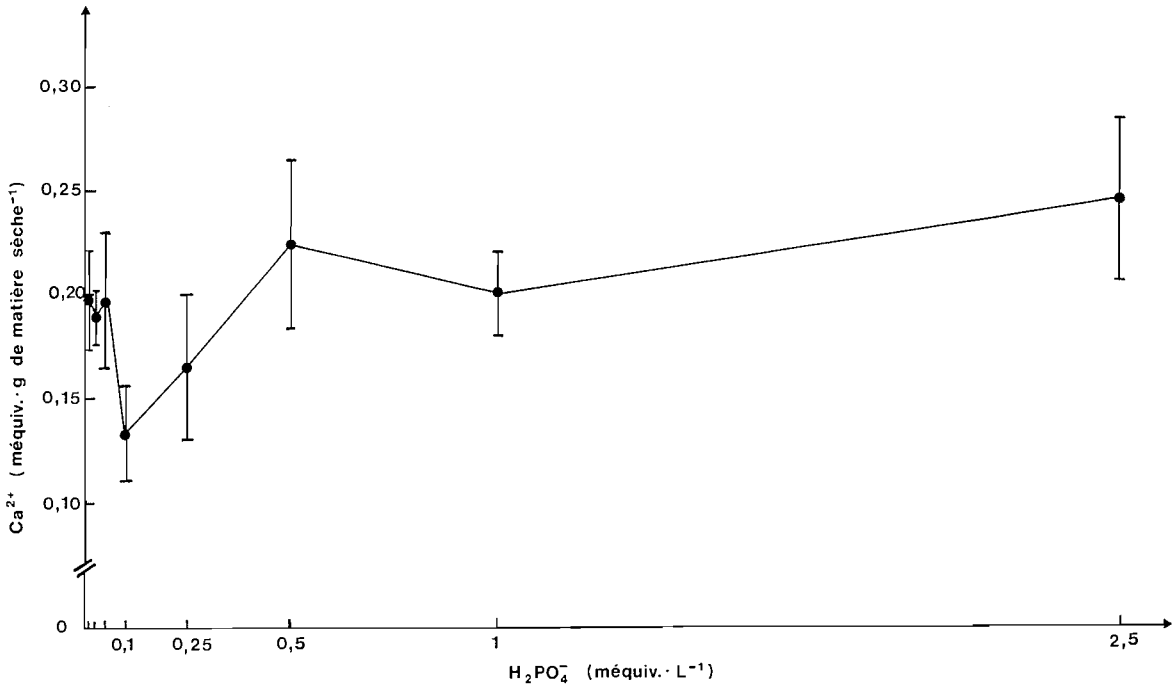

FIG. 7. Évolution de la teneur en calcium des thalles du *Pisolithus tinctorius* en fonction de la concentration en orthophosphate du milieu de culture (après 25 jours). Les intervalles de confiance des moyennes de cette teneur sont figurés pour $P = 0,05$.

Dans les deux expériences menées en fonction de la concentration en $H_2PO_4^-$ du milieu, la masse des thalles est respectivement comprise entre 50 et 150 mg de matière sèche (après 25 jours de croissance) (fig. 2A), et entre 30 et 90 mg de matière sèche seulement (après 21 jours de croissance) (fig. 6B et 6C). Cette différence pourrait provenir d'une durée plus brève de la deuxième expérience mais elle pourrait aussi être liée à l'accumulation plus importante de polyphosphates.

Enfin, pour Rolin *et al.* (1982), le rapport de l'orthophosphate au P total dans le mycélium augmente avec la concentration du milieu en $H_2PO_4^-$. L'apparente contradiction avec nos résultats ne peut être résolue que si l'on admet que le rapport entre les polyphosphates de faible masse moléculaire et le P total diminue plus fortement que ne s'accroît le rapport précédent, quand la concentration en $H_2PO_4^-$ augmente dans la solution externe. D'autre part, la synthèse de polyphosphates (notamment ceux à masse moléculaire élevée) dépend de l'activité métabolique du mycélium, en particulier de la durée de la culture (Clément et Mousain 1983). Or, sur ce point déjà, l'expérience présentée ici diffère de celle de Rolin *et al.* (21 contre 30 jours de croissance); en outre, ces auteurs ont étudié l'*Hebeloma cylindrosporum* et rien n'indique que le comportement de cette espèce soit semblable à celui du *P. tinctorius*.

Corrélation entre les teneurs en phosphore total, en calcium et en potassium dans les mycélia

L'évolution de la teneur en Ca^{2+} du mycélium de *P. tinctorius* en fonction de la concentration en $H_2PO_4^-$ du milieu est représentée dans la figure 7: cette teneur en Ca^{2+} est probablement surestimée pour les faibles concentrations en $H_2PO_4^-$ (0,010, 0,025, 0,050 méquiv. · L^{-1}) du fait de la moindre croissance des thalles à ces concentrations (masse inférieure à 100 mg de matière sèche; fig. 2A). Cependant, même si l'on ne retient que les données correspondant aux concentrations en $H_2PO_4^-$ du milieu égales ou supérieures à 0,1 méquiv. · L^{-1}, la corrélation entre les teneurs des mycélia en Ca^{2+} (fig. 7) et en P total (fig. 4A) est assez faible ($0 \leqslant r = 0,28 \leqslant 0,62$) et non significative ($P = 0,05$). Il ne semblerait donc pas, d'après ces résultats, que l'ion Ca^{2+} soit le principal cation d'accompagnement de $H_2PO_4^-$.

Les courbes d'accumulation du phosphore total et du potassium dans les thalles en fonction de la concentration en Ca^{2+} dans le milieu offrent une certaine similitude entre elles et avec la courbe de croissance du *P. tinctorius* (fig. 3 et 8). Le coefficient de corrélation entre les teneurs en K^+ et en $H_2PO_4^-$ des thalles est significatif à $P = 0,01$ ($0,197 \leqslant r = 0,486 \leqslant 0,696$). Par contre, la corrélation entre les teneurs des mycelia en calcium (fig. 5A) et en P total (fig. 8) n'est pas significative ($P = 0,05$). Le cation d'accompagnement privilégié de $H_2PO_4^-$ semble donc être K^+, même quand le phosphore est apporté dans la solution nutritive sous forme de dihydrogénophosphate de sodium.

Conclusion

Les milieux classiquement utilisés pour cultiver les champignons ectomycorhiziens sont largement excédentaires par rapport aux besoins en phosphore des thalles des quatre espèces étudiées: leur plateau de croissance est atteint pour des concentrations en $H_2PO_4^-$ du milieu égales au maximum à 0,5 méquiv. · L^{-1} alors que les milieux usuels (Pachlewski 1967; Marx 1969) en contiennent 7,5 méquiv. · L^{-1}. Du point de vue de la croissance du mycélium, de telles concentrations de $H_2PO_4^-$ sont donc inutiles. Elles conduisent à des accumulations importantes de phosphore total dans le mycélium du *P. tinctorius* (environ 0,3 méquiv. $H_2PO_4^-$ · g de matière sèche^{-1} pour 2,5 méquiv. $H_2PO_4^-$ · L^{-1}). La croissance est pratiquement une fonction linéaire de la teneur en P des thalles jusqu'à approximativement 0,25 méquiv. $H_2PO_4^-$ · g de matière sèche^{-1}, teneur qui est atteinte pour 0,25 méquiv. $H_2PO_4^-$ · L^{-1} dans le milieu: au-delà de cette valeur, la croissance des thalles n'augmente plus; par contre, le phosphore peut ou non continuer à s'accumuler. Cette accumulation au-delà du "seuil critique" défini antérieurement (Prévot et Ollagnier 1957; Mengel et

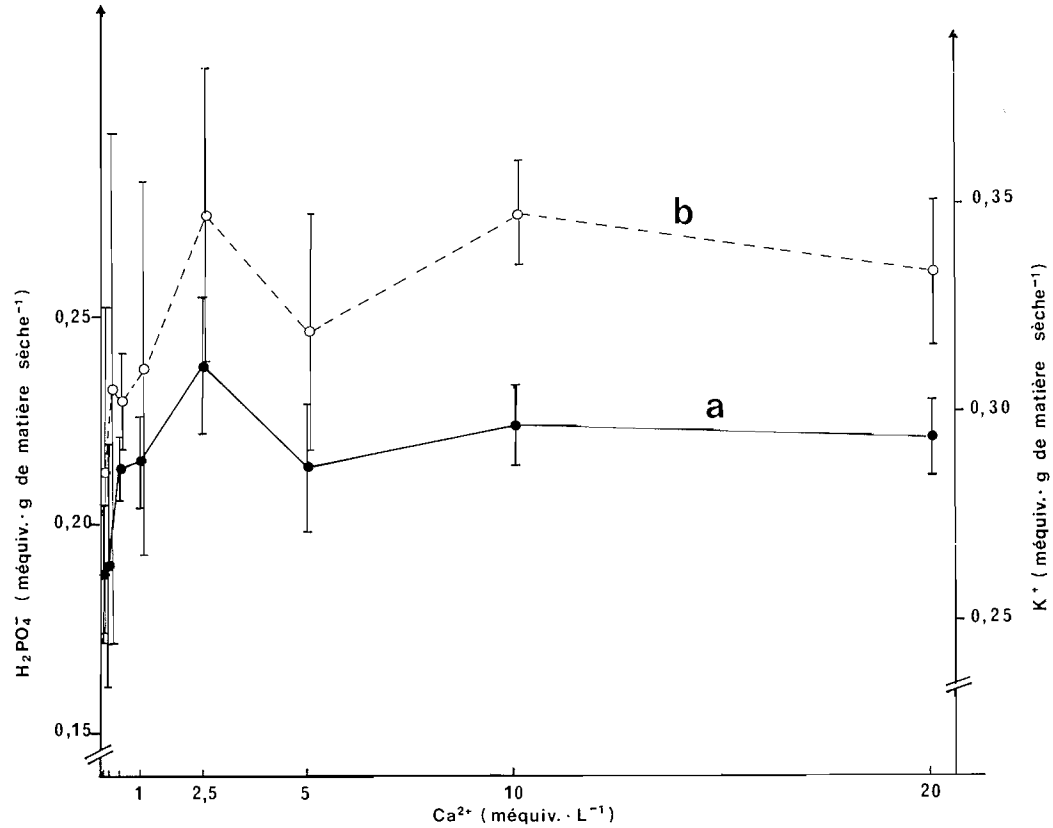

FIG. 8. Évolution des teneurs en phosphore total (*a*, trait plein) et en potassium (*b*, trait pointillé) dans les thalles du *Pisolithus tinctorius* en fonction de la concentration en calcium du milieu de culture (après 20 jours). Les intervalles de confiance des moyennes sont figurés pour $P = 0,05$. La teneur en potassium (y) est une fonction linéaire de la teneur en phosphore total (x), soit

[4] $y = 0,795x + 150,8$

Kirkby 1979), n'a été observée que dans une seule des deux expériences réalisées au cours de ce travail: la courbe expérimentale de la figure 6B reproduit alors parfaitement la courbe théorique (Prévot et Ollagnier 1957; Mengel et Kirkby 1979).

Dans ce cas, une partie importante du phosphore s'accumule vraisemblablement sous forme de polyphosphates inorganiques de masse moléculaire élevée. La différence constatée entre les deux résultats expérimentaux précédents pourrait provenir d'une accumulation plus grande de polyphosphates insolubles lors de la deuxième expérience. En effet, le substrat énergétique (glucose) n'étant pas limitant et les polyphosphates étant insolubles (donc immobilisés et inutiles pour la croissance du mycélium), l'accumulation de ces polyphosphates s'effectuerait au détriment de la croissance des thalles. Cette mise en réserve de phosphore et d'énergie pourrait expliquer la "consommation de luxe" de P observée dans la deuxième expérience. L'importance relative des polyphosphates inorganiques accumulés dans les mycélia et leur relation avec la croissance sont à déterminer dans des études ultérieures.

D'autre part, une quantité trop faible de calcium dans le milieu (inférieure à 0,5 méquiv. $Ca^{2+} \cdot L^{-1}$) peut limiter la croissance des thalles, mais de fortes concentrations externes en Ca^{2+} ne sont pas indispensables à la croissance du *P. tinctorius*. Le calcium est accumulé dans les thalles de cette espèce (probablement dans la vacuole et (ou) sur la surface des hyphes) au-delà de teneurs de l'ordre de 0,1 méquiv. $Ca^{2+} \cdot g$ de matière sèche^{-1}, teneurs qui sont atteintes pour des concentrations d'environ 2 méquiv. $Ca^{2+} \cdot L^{-1}$ dans la solution. Cette accumulation est plus faible que celle observée pour les mêmes concentrations externes en Ca^{2+}, chez les végétaux supérieurs. La croissance augmente en fonction de la teneur en Ca^{2+} des thalles jusqu'à des valeurs inférieures à 0,2 méquiv. $Ca^{2+} \cdot g$ de matière sèche^{-1}, qui sont obtenues avec 5 méquiv. $Ca^{2+} \cdot L^{-1}$ dans le milieu. La localisation intracellulaire (vacuoles) et extracellulaire (parois, surface des hyphes) du calcium accumulé dans les thalles et sa répartition quantitative restent à préciser.

Compte tenu de l'absence de corrélation significative entre les teneurs en calcium et en phosphore des thalles et de l'existence d'une telle corrélation entre les teneurs en potassium et en phosphore, c'est surtout l'ion K^+ qui est vraisemblablement associé à l'ion $H_2PO_4^-$.

Remerciements

Une partie de ce travail a été réalisée grâce à l'aide du Centre national de la recherche scientifique (AI 03327).

ATHANASSIOU, Z. 1979. Contribution à l'étude des mycorhizes du Pin d'Alep. Thèse de doctorat d'ingénieur, Université Paris-Sud, France.

BEEVER, R. E., et D. J. W. BURNS. 1980. Phosphorus metabolism. Adv. Bot. Res. **8**: 129–132.

BIELESKI, R. L. 1973. Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. Annu. Rev. Plant Physiol. **24**: 225–252.

BURNETT, J. H. 1976. Fundamentals of mycology. 2nd ed. Edward Arnold, London.

CALLEJA, M., D. MOUSAIN, B. LECOUVREUR et J. D'AUZAC. 1980. Influence de la carence phosphatée sur les activités phosphatases

acides de trois champignons mycorhiziens: *Hebeloma edurum* Metrod., *Suillus granulatus* (L. ex Fr.) O. Küntze et *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch. Physiol. Veg. **18**(3): 489–504.

CLÉMENT, J. D., et D. MOUSAIN. 1983. Étude de l'accumulation de polyphosphates chez les symbiotes ectomycorhiziens cultivés isolément ou en association. Agronomie, **3**(5): 495.

DAGNÉLIE, P. 1975. Théorie et méthodes statistiques. Applications agronomiques. Vol. 2. Les méthodes de l'interférence statistique. Les Presses agronomiques de Gembloux, Gembloux.

D'AUZAC, J., et S. PUJARNISCLE. 1959. Sur les différentes formes de phosphore présentes dans le latex d'hévéa. Rev. Gen. Caoutch. **36**: 862–870.

DUCLOS, J. L. 1981. Contribution à l'étude expérimentale des endomycorhizes des Éricacées. Étude sur *Erica carnea* L. et quelques variétés horticoles: aspects nutritionnels et ultrastructuraux. Thèse de doctorat de 3^{e} cycle en biologie et physiologie végétales, Université Claude-Bernard, Lyon 1, France.

FROIDEVAUX, L., et I. KÄLIN. 1981. Accumulation d'oxalate de calcium dans les nodules du champignon mycorhizien *Hebeloma crustuliniforme*: importance du phénomène pour la nutrition de l'arbre. Schweiz Z. Forstwes. **132**: 339–344.

GAY, G. 1978. Influence de trois champignons ectomycorhiziens, *Hebeloma sarcophyllum* Peck, *Hebeloma hiemale* Bresadola et *Suillus bellinii* (Inz.) Marchand, sur la croissance, le développement et la nutrition minérale de jeunes plantules de *Pinus halepensis* Mill. Thèse de doctorat de 3^{e} cycle en biologie végétale, Université Claude-Bernard, Lyon 1, France.

GHORBAL, M. H., et L. SALSAC. 1972. Comparaison de l'absorption du calcium par les racines de pin d'Alep et de pin maritime. *Dans* Isotopes and radiation in soil—plant relationships including forestry. International Atomic Energy Agency, Vienne. pp. 313–326.

HACSKAYLO, E., V. LILLY et H. BARNETT. 1954. Growth of fungi on three sources of nitrogen. Mycologia, **46**: 691–701.

KULAEV, I. S. 1975. Biochemistry of inorganic polyphosphates. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. **73**: 131–158.

LAMANT, A., N. CATHALA, L. SALSAC et R. HELLER. 1977. Application du fractionnement cellulaire à l'étude de la répartition des cations dans les racines de végétaux supérieurs. Physiol. Veg. **15**: 797–809.

LANGEN, P., et E. LISS. 1958. Über Bildung und Umsatz der Polyphosphate der Hefe. Biochem. Z. **330**: 445–466.

LAPEYRIE, F. 1983. Recherches préliminaires sur le rôle des ectomycorhizes dans l'implantation d'*Eucalyptus delegatensis* en France: conditions d'inoculation des plants; comportement des partenaires en présence de calcaire. Thèse de doctorat de 3^{e} cycle en biologie et physiologie végétales, Université Claude-Bernard, Lyon 1, France.

LUNDEBERG, G. 1970. Utilisation of various nitrogen sources, in particular bound soil nitrogen, by mycorrhizal fungi. Stud. For. Suec. **79**: 1–95.

LUPPI, A. M., et A. FONTANA. 1967. Sulla utilizzazione dell'azoto ammoniacale e dell' azoto nitrico da parte del *Boletus luteus* L. in coltura. Allionia, **13**: 195–200.

——— 1972. Fonti non usuali di carbono per il *Boletus luteus* L. in coltura. Allionia, **18**: 163–166.

MARX, D. H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology, **59**: 153–163.

MELIN, E., et P. MIKOLA. 1948. Effect of some amino-acids on the growth of *Cenococcum graniforme*. Physiol. Plant. **1**: 109–112.

MELIN, E., et B. NORKRANS. 1948. Amino-acids and the growth of *Lactarius deliciosus* (L.) Fr. Physiol. Plant. **1**: 174–184.

MENGEL, K., et E. A. KIRKBY. 1979. Principles of plant nutrition. 2nd ed. International Potash Institute, Berne.

MENTION, M., et C. PLASSARD. 1983. Comparaison de la nutrition nitrique et ammoniacale de quatre espèces de Basidiomycètes ectomycorhiziens. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. **297**: 489–492.

MITSCHERLICH, E. A. 1954. Die Ertragsgesetze. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin, Vortr. Schr. **31**.

MORIZET, J., et M. MINGEAU. 1976. Influence des facteurs du milieu sur l'absorption hydrique (étude effectuée sur tomate décapitée en exsudation). I. Facteurs nutritionnels. Ann. Agron. **27**(2): 183–205.

MOUSAIN, D., L. SALSAC et J. D'AUZAC. 1981. Nutrition phosphatée et activités phosphatases acides des champignons mycorhiziens. *Dans* Program and Abstracts of the 5th North American Conference on Mycorrhizae. *Éditeurs*: J. A. Fortin et V. Furlan. Université Laval, Québec, Canada.

PACHLEWSKI, R. 1967. Investigations of pure culture of mycorrhizal fungi of pine (*Pinus silvestris* L.). Forest Research Institute, Varsovie.

PALMER, J. G., et E. HACSKAYLO. 1970. Ectomycorrhizal fungi in pure culture. I. Growth on single carbon sources. Physiol. Plant. **23**: 1187–1197.

PEARSON, V., et D. J. READ. 1975. The physiology of the mycorrhizal endophyte of *Calluna vulgaris*. Trans. Br. Mycol. Soc. **64**(1): 1–7.

PRÉVOT, P., et M. OLLAGNIER. 1957. Méthode d'utilisation du diagnostic foliaire. *Dans* Analyse des plantes et problèmes des fumures minérales. Institut de recherches pour les huiles et les oléagineux, Paris. pp. 177–192.

ROLIN, D., F. LE TACON et F. LARHER. 1982. Physiologie, caractérisation des différentes fractions du phosphore chez le champignon mycorhizogène *Hebeloma cylindrosporum*. *Dans* Les mycorhizes: biologie et utilisation. Vol. 13. *Éditeurs*: S. Gianinazzi, V. Gianinazzi-Pearson et A. Trouvelot. Institut national de la recherche agronomique, Paris. pp. 101–105.

SALSAC, L. 1973. Absorption du calcium par les racines de féverole (calcicole) et de lupin jaune (calcifuge). Physiol. Veg. **11**: 95–119.

SALSAC, L., M. MENTION, C. PLASSARD et D. MOUSAIN. 1982. Données sur la nutrition azotée des champignons ectomycorhiziens. *Dans* Les mycorhizes: biologie et utilisation. Vol. 13. *Éditeurs*: S. Gianinazzi, V. Gianinazzi-Pearson et A. Trouvelot. Institut national de la recherche agronomique, Paris. pp. 129–140.

SHERE,S. M., et L. JACOBSON. 1970. Mineral uptake in *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Physiol. Plant. **23**: 51–62.

SMITH, P. F. 1962. Mineral analysis of plant tissues. Annu. Rev. Plant Physiol. **13**: 81–108.

TAUSSKY, H. H., et E. SHORR. 1953. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. J. Biol. Chem. **202**: 675–685.